

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)

Isolierung Z-DNS-bindender Proteine aus dem Hoden des Stieres

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
STEPHAN HUBERT GUT
Tierarzt
von Mauensee

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. med. E. Jenny, Korreferent

Zürich 1987
Zentralstelle der Studentenschaft



Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)

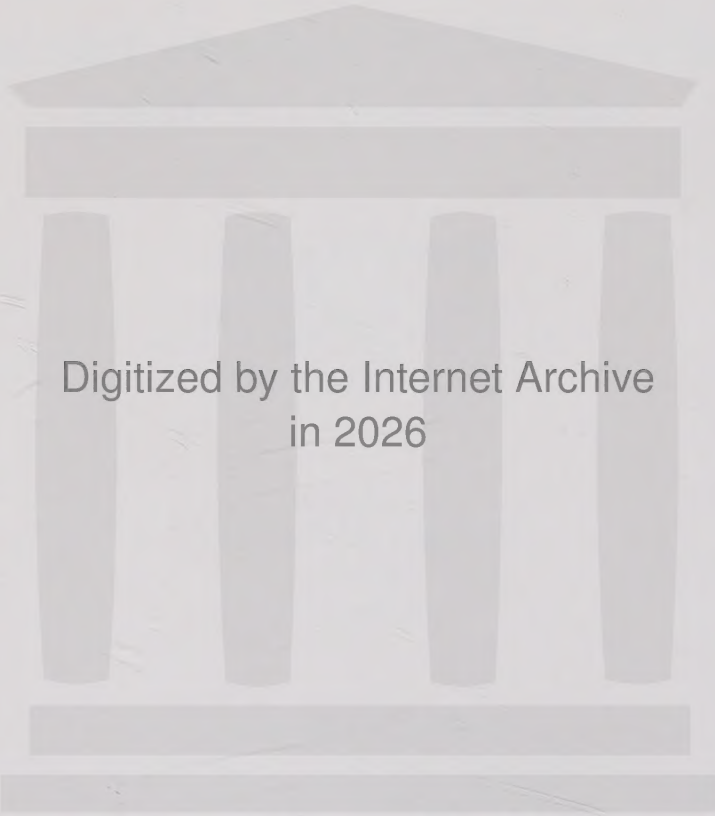
Isolierung Z-DNS-bindender Proteine aus dem Hoden des Stieres

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
STEPHAN HUBERT GUT
Tierarzt
von Mauensee

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. med. E. Jenny, Korreferent

Zürich 1987
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507201_0015

Für Brigitte und meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel 1:	Einführung und Problemstellung	1
Kapitel 2:	Material	6
2.1 :	<i>Gewebe</i>	6
2.2 :	<i>Chemikalien, Proteine, Nukleinsäuren</i>	6
2.3 :	<i>Isotop</i>	7
2.4 :	<i>Pufferlösungen</i>	7
2.5 :	<i>Apparate</i>	9
Kapitel 3:	Methoden	10
3.1 :	<i>Proteinisolation</i>	10
3.1.1:	Gewebeextraktion	10
3.1.2:	Kationentauscherchromatographie	11
3.1.3:	Z-DNS-Affinitätschromatographie	12
3.1.4:	FPLC-Anionentauscherchromatographie	13
3.2 :	<i>DNS-Bindungstests</i>	14
3.2.1:	Filterbindungstest	14
3.2.2:	Bindungstest nach Weintraub	15
3.3 :	<i>Weitere Methoden</i>	17
3.3.1:	Herstellung von Z-DNS	17
3.3.2:	Kinasierung	17
3.3.3:	Immobilisierung von Z-DNS für die Affinitätschromatographie	18
3.3.4:	Plattengelelektrophorese	18
3.3.5:	Behandlung adsorbierender Oberflächen	19
3.3.6:	Konzentrierung der Proteine	20
3.3.7:	Proteinbestimmung	20
3.4 :	<i>Flussdiagramm der Proteinisolation</i>	21

Kapitel 4:	Resultate	22
4.1	: Gewebeextrakt	22
4.2	: Kationentauscherchromatographie	22
4.3	: Z-DNS-Affinitätschromatographie	27
4.4	: FPLC-Anionentauscherchromatographie	30
4.4.1:	Sammelfraktion-R3	30
4.4.2:	Sammelfraktion-R4	33
Kapitel: 5	Diskussion	37
Kapitel: 6	Zusammenfassung	44
Kapitel: 7	Literaturverzeichnis	45
Kapitel: 8	Dankesadressen	55
Kapitel: 9	Lebenslauf	56

Verzeichnis der Abkürzungen

dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
dG	Desoxyguanosin
dT	Desoxythymidin
[γ - ³² P] ATP	Adenosin-5' [γ - ³² P]-Triphosphat
Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)	Doppelsträngiges Kopolymer aus alternierenden dG- und dC-Einheiten, welches bei niedriger Ionenstärke in B-, bei hoher Ionenstärke in Z-Konformation vorliegt.
Bromiertes Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)	Doppelsträngiges Kopolymer aus alternierenden dG- und dC-Einheiten, welche statistisch zufällig mit Brom substituiert sind. Die Substitution erfolgt am C8 Atom von Guanin und am C5 Atom des Cytidin. Das Kopolymer liegt durch diese Modifikation auch bei physiologischer Ionenstärke in Z-Konformation vor.
MG	Molekulargewicht
kD	Kilodalton (Masse von tausend Wasserstoffatomen)
BSA	bovines Serumalbumin
g	Zentrifugalbeschleunigung; wird als Vielfaches der Erdbeschleunigung angegeben und ist für die Mitte des Zentrifugenröhrchens berechnet.
A	Absorption

U/min	Umdrehungen pro Minute
cpm	Counts per minute; die vom Gerät pro Minute gezählten radioaktiven Zerfälle.
cm	Centimeter
μm	Mikrometer
nm	Nanometer
h	Stunde
min	Minute
g	Gramm
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
l	Liter
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
M	Molar
mM	Millimolar
Gew/Vol	Gewicht pro Volumen; prozentuale Konzentrationsangabe in Gramm pro 100 ml
Vol/Vol	Volumen pro Volumen; prozentuale Konzentrationsangabe in ml pro 100 ml
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
SDS	Natriumdodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol
Thimerosal	Na-Aethylmercurithiosalicylat

Kapitel 1

EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Eines der wichtigsten Moleküle für die Zelle ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS). Sie ist für die Weitergabe aller Erbinformationen von Generation zu Generation verantwortlich. Watson und Crick entdeckten 1953 die noch heute gültige Struktur der B-DNS. Erste Anzeichen einer von der B-Konformation abweichenden Struktur fanden Pohl und Jovin 1972. Bei der Messung des Cirkulardichroismus von Poly(dG-dC)•poly(dG-dC), einem synthetischen Polynukleotid, stellten sie bei steigender Salzkonzentration eine Inversion des Spektrums fest. Sie postulierten einen Umschlag der rechts- in eine linkshändige DNS-Struktur. Diese konnte jedoch erst mittels Röntgenstrukturanalyse eines Kristalles des Hexanukleotides d(CpGpCpGpCpG) nachgewiesen werden (Wang et al., 1979 ; Crawford et al., 1980). Der zickzackförmige Verlauf des Zucker-Phosphatgerüsts trug der neu entdeckten DNS-Konformation den Namen Z-DNS ein. Z-DNS stellt eine linkshändige, doppelsträngige Struktur dar, die in natürlichen und synthetischen Polynukleotiden an das Vorkommen von alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen gebunden ist. Da die Z-Konformation auf einem höheren chemischen Energieniveau liegt, bevorzugt die DNS unter physiologischen Bedingungen die energetisch günstigere B-Konformation.

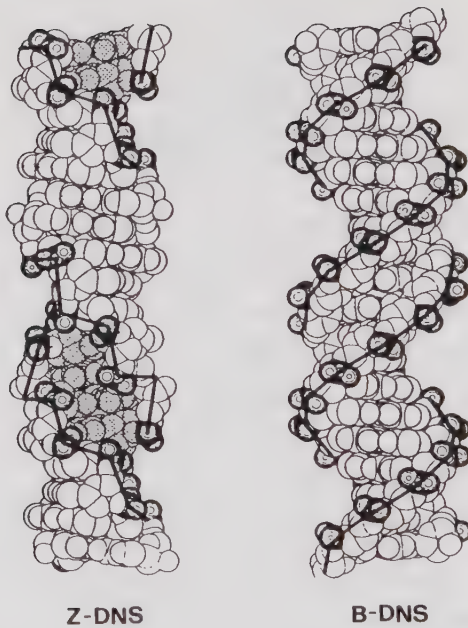


Abb. 1: Van der Waals-Modell der Z-DNS und B-DNS.
Die Phosphatgruppen sind durch Linien miteinander verbunden, wodurch der zickzackförmige Verlauf des Zucker-Phosphatgerüsts in der Z-Struktur leicht erkenntlich wird (aus Wang et al., 1979).

Es ist aber möglich, DNS geeigneter Sequenz in die Z-Konformation zu zwingen; zum Beispiel durch kovalente Modifikation der DNS, Erhöhung der Ionenkonzentration im Lösungsmittel, Modifikation des Lösungsmittels durch Alkohole, Bindung von interkalierenden Rea-

gentien oder anderer kleiner Moleküle an die DNS und Torsion infolge superhelikaler Ueberdrehung (Uebersichtsartikel : Rich et al., 1984). Als weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von Z-DNS kann man sich die spezifische Bindung von Proteinen vorstellen. Unter physiologischen Bedingungen könnten diese auch in der Lage sein, Z-DNS zu induzieren. Die Frage, ob DNS in vivo wechselseitig in verschiedene Konformationen übergehen kann, ist noch immer kontrovers (Marx, 1985). Einige Autoren sehen in der Z-DNS eine natürliche Möglichkeit zur Regulation von Genen, für andere ist sie nicht mehr als eine extreme Denaturierungsform.

Da die Z-DNS im Gegensatz zur B-DNS stark antigen ist, war es möglich, Antikörper gegen diese herzustellen (Lafer et al., 1981). Mit diesen wurde in natürlichen DNS-Sequenzen nach Z-DNS gesucht. Der immunologische Nachweis von Z-DNS gelang in den Polytänchromosomen der Speicheldrüse von *Drosophila melanogaster* (Nordheim et al., 1981), in den Polytänchromosomen von *Chironomus thummi thummi* (Lemeunier et al., 1982), in Bakterienplasmiden (DiCapua et al., 1983), im Makronukleus des Ciliaten *Stylonychia mytilus* (Lipps et al., 1983), in Rattengewebe (Morgenegg et al., 1983) und in Metaphasechromosomen von Menschen und Primaten (Viegas et al., 1983). Beim immunhistochemischen Nachweis von Z-DNS könnte es sich jedoch um ein Fixationsartefakt handeln, da keine positive Immunreaktion in unfixierter DNS zu finden war (Hill & Stollar, 1983).



Ueber die biologische Funktion der Z-DNS kann nur spekuliert werden. Potentiell Z-DNS bildende Sequenzen wurden in der Nähe von genregulatorischen Regionen gefunden: in der Enhancersequenz des SV40-Virus (Nordheim & Rich, 1983), in der Nähe einer Kontrollregion des menschlichen Parathormongenes (Vasicek et al., 1983), im Rattensomatostatingen (Hayes & Dixon, 1985), im Protamingen der Regenbogenforelle (Aiken et al., 1985) und vor einem Promotor des Bakteriophagen Φ X174 (Revet et al., 1985). Hinweise auf die Kontrollfunktion der Z-DNS ergeben sich auch aus der Beobachtung, dass die RNA-Polymerase von *Escherichia coli* weniger aktiv ist, wenn die Matritze in Z-Konformation vorliegt (Butzow et al., 1984). Dasselbe gilt auch für die HhaI-Methyltransferase (Vardimon et al., 1984), verschiedene Restriktionsendonukleasen (Vardimon et al., 1984; Azorin et al., 1984) und für diverse DNS-Reparaturenzyme (Lagravère et al., 1984; Boiteux et al., 1985).

Wie schon erwähnt, wäre es möglich, dass in vivo spezifische Z-DNS-bindende Proteine die Z-Konformation stabilisieren oder induzieren können. So wurden Z-DNS-bindende Proteine aus *Drosophila melanogaster* (Nordheim et al., 1982), aus dem SV40-Virus (Azorin & Rich, 1985), aus dem Bakterium *Diplococcus radiodurans* (Kitayama et al., 1985) und aus Weizen (Lafer et al., 1985) isoliert und in Neuronen des Rattengehirnes nachgewiesen (Kuenzle et al., 1983). Da diese Z-DNS-bindenden Proteine nicht in genügender Reinheit isoliert wurden, war eine Aussage über ihre biologische Funktion

nicht möglich. Ein möglicher Hinweis für die biologische Funktion eines Z-DNS-bindenden Proteines ergab sich im Falle des RecI-Proteines aus *Ustilago maydis*, einem hefeähnlichen Pilz (Kmiec und Holloman, 1982, 1985). Dieses Protein katalysiert die homologe Rekombination von DNS, wobei diese vorübergehend eine Z-ähnliche Struktur annimmt. Es bindet 75 mal stärker an Z-DNS [bromiertes Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)], als an B-DNS [Poly(dG-dC)•poly (dG-dC)].

Meine Aufgabe war es, ein Z-DNS-bindendes Protein erstmals aus Säugetiergewebe rein und in nativer Form zu isolieren, um damit eine Grundlage für spätere Untersuchungen bezüglich der biologischen Funktion des Proteins und vielleicht auch der Z-DNS zu schaffen.

Kapitel 2

MATERIAL

2.1 Gewebe

Die Z-DNS-bindenden Proteine wurden aus dem Hoden geschlechtsreifer Stiere isoliert. Der Hoden der 15-18 Monate alten Stiere wurde sofort nach der Schlachtung entnommen, auf Eis gelegt und ins Institut transportiert, wo am gleichen Tag mit der Proteinextraktion begonnen wurde.

2.2 Chemikalien, Proteine, Nukleinsäuren

- Nalgene Sterilization Filter (0,45µm)	Semadeni
- Zellulosenitrat-Membranfilter BA 85	Schleicher&Schuell
- Spectrapor 3 - Dialysemembran	Bender&Hobein
- Fuji Röntgenfilme	Erno
- CM-Trisacryl M	LKB
- Ultrogel AcA 44	LKB
- SP-Sephadex C 50	Pharmacia
- Mono Q FPLC-Säule	Pharmacia
- Urea, electrophoresis purity reagent	Bio Rad
- SDS, electrophoresis purity reagent	Bio Rad
- Protein Assay	Bio Rad

- Silver Stain	Bio Rad
- Thimerosal	Fluka
- Ficoll 400	Pharmacia
- Polyvinylpyrrolidon	Sigma
- Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
- T4-Polynukleotidkinase	P.H.Stehelin
- Histonlyophilisat	Worthington
- Histon H1	Sigma
- Bovines Serumalbumin	Fluka
- Molekulargewichtsmarker, low	Bio Rad
- Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)	P-L Biochemicals, Inc.

2.3 Isotop

- [γ - ^{32}P] ATP	Amersham PP 132
--------------------------------------	-----------------

2.4 Pufferlösungen

- Extraktionspuffer :	20 mM Natriumphosphat (pH 7,0) 0,35 M NaCl
- Puffer A :	20 mM Natriumphosphat (pH 7,0)
- Puffer B :	20 mM Natriumphosphat (pH 7,0) 1 m NaCl
- Puffer C :	25 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- Puffer D :	25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 M KCl

- Puffer-R1 :
 - 5 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 - 0,1 mM Na-EDTA
 - 0,1 mM DTT
 - 5% (Gew/Vol) Glycerin
- Puffer-R2 :
 - wie Puffer-R1, jedoch mit
 - 150 mM NaCl
- Puffer-R3 :
 - wie Puffer-R1, jedoch mit
 - 250 mM NaCl
- Puffer-R4 :
 - wie Puffer-R1, jedoch mit
 - 1 M NaCl
- Puffer-R5 :
 - wie Puffer-R1, jedoch mit
 - 25µg/ml BSA
- Renaturierungspuffer :
 - 10 mM Tris-HCl (pH 7,0)
 - 50 mM NaCl
 - 2 mM Na-EDTA
 - 0,1 mM DTT
 - 4 M Harnstoff
- Transferpuffer :
 - 10 mM Tris-HCl (pH 7,0)
 - 50 mM NaCl
 - 2 mM Na-EDTA
 - 0,1 mM DTT

- Bindungspuffer :
 - 10 mM Tris-HCl (pH 7,0)
 - 50 mM NaCl
 - 1 mM Na-EDTA
 - 0,02 % (Gew/Vol) BSA
 - 0,02 % (Gew/Vol) Ficoll
 - 0,02 % (Gew/Vol) Polyvinylpyrrolidon

2.5 Apparate

- Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B mit dem Festwinkelrotor SS 34
- Ultrazentrifuge Sorvall OTD 65B mit dem Ausschwingrotor AH 627
- Flüssigkeitsszintillationszähler MR 300 Kontron
- Spektrophotometer Uvicon 810 Kontron
- Mikro-ELISA-Automat Virion
- FPLC-System Pharmacia
- Durchflussphotometer 2238 Uvicord SII LKB
- Fraktionensammler Ultrarac 7000 LKB
- Fraktionensammler Modell 201 Gilson
- Filtrierapparatur Minifold Schleicher&Schuell
- Gelelektrophoresekommer Eigenbau
- Gelelektrophoreseapparatur Mighty Small Hoefer
- Spannungs- und Stromspeisegerät Modell 3000/300 Bio Rad
- Röntgenfilmkassette (18×24cm) Okamoto
- Verstärkerfolie Kyokko special 781725
- Ultraschallgerät Sonifier B15 Branson
- Teflonhomogenisator (60ml) B.Braun

Kapitel 3

METHODEN

3.1 Proteinisolation

Alle Arbeiten während der Proteinisolation wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Es wurden nur Trennmethoden verwendet, bei welchen der native Zustand der Proteine und somit deren biologische Funktion bestmöglich erhalten blieb.

3.1.1 Gewebeextraktion

Frisch entnommener Stierhoden wurde auf Eis gelegt und vom Nebenhoden und der Hodenkapsel befreit. Ein mit dem Skalpell herausgeschnittenes Segment von 50 g Gewicht wurde in einer Petrischale mit wenig Extraktionspuffer fein zerhackt. Anschliessend wurde das zerkleinerte Gewebe in einen Messzylinder gegeben und mit Extraktionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 150 ml aufgefüllt. Die Gewebesuspension wurde in einem motorgetriebenen Teflonhomogenisator (60 ml) mit 10 Auf- und Abbewegungen bei 1700 U/min homogenisiert. Nach der dritten und sechsten Stossbewegung wurde der Homogenisator zwei Minuten in Eis gestellt. Die rötlich-gelbe

Suspension wurde anschliessend während 30 min bei 18'000 g in der Sorvall Kühlzentrifuge (SS-34 Rotor, 14'000 U/min) zentrifugiert. Die obenaufschwimmende Fettschicht und das Sediment wurden verworfen und der verbleibende Ueberstand nochmals mit 18'000 g zentrifugiert. Nach erneuter Entfernung von Fettschicht und Sediment wurde der Ueberstand während 48 h dreimal gegen 2 l Puffer A dialysiert. Das Retentat wurde zweimal zentrifugiert: zuerst während 30 min bei 18'000 g in der Sorvall Kühlzentrifuge (SS-34 Rotor, 14'000 U/min), und anschliessend nach Entfernung des Sedimentes nochmals während 3 h mit 65'000 g in der Sorvall Ultra-zentrifuge (AH-627 Rotor, 22'000 U/min). Der Ueberstand wurde in mehreren Portionen sterilfiltriert (Porengrosse 0,45 µm). Der nun klare Extrakt wies eine Absorption bei 280 nm zwischen 7-11 auf. Der Extrakt wurde in Portionen zu 5 ml bei -80°C gelagert.

3.1.2 Kationentauscherchromatographie

Agrund von Vorversuchen wurde zu präparativen Zwecken eine Hochdruckglassäule (Durchmesser 5 cm, Füllhöhe 46 cm) gewählt. Die Säule fasste 900 ml eines Kationentauschers (CM-Trisacryl M), welcher in Puffer A äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit 500 mg Hodenprotein, entsprechend 50-70 ml des Extraktes, beladen. Nachdem der Extrakt ins Gelbett eingesickert war, wurde mit Puffer A eluiert. Dazu wurde eine Perpexpumpe (10 ml/min) verwendet.

Das Eluat wurde mittels Durchflussphotometer bei 280 nm überwacht und die Absorptionskurve aufgezeichnet. Sobald die Absorption auf den Ausgangswert zurückgekehrt war, wurde mit Puffer B gewaschen. Das gesamte Eluat wurde in Fraktionen zu 10 ml aufgefangen. Für die Ueberwachung der Bindungseigenschaften (siehe 3.2) wurde jeder Fraktion ein Aliquot von 1 ml entnommen. Der Rest wurde bis zur weiteren Auftrennung (siehe 3.1.3) bei -20°C gelagert.

3.1.3 Z-DNS-Affinitätschromatographie

Fünf Milliliter einer auf Grund des Bindungstestes nach Weintraub ausgewählten Fraktion der Kationentauscherchromatographie (siehe 3.1.2) wurden auf 0,5 ml konzentriert (siehe 3.3.6) und nachher mit Puffer-R1 auf eine Endkonzentration von 0,15 M NaCl verdünnt. Zwei Milliliter der gequollenen Z-DNS-Affinitätsmatrix (siehe 3.3.3) wurden in Puffer-R2 äquilibriert, in eine Wegwerfspritze (5 ml) eingefüllt und mit der Probe beladen. Dazu wurde die Probe mit einer Perpexpumpe (5.7 ml/h) aus einem Vorratsgefäß auf die Matrix gepumpt, von der sie wieder in das Vorratsgefäß zurücktropfte. Die Lösung wurde im Kühlraum während 20 Stunden in Umlauf gehalten. Am nächsten Tag wurde die Matrix abgekoppelt, mit 2 ml Puffer-R2 gespült und an einen Fraktionensammler angeschlossen. Eluiert wurde mit 5 ml Puffer-R3 und anschliessend

mit 5 ml Puffer-R4 (5,7 ml/h). Das Eluat wurde in Fraktionen zu je acht Tropfen (240 µl) in einer albuminbehandelten Mikrotiterplatte gesammelt (siehe 3.3.5). Wegen der geringen Volumina und der kleinen Proteinmengen im Eluat wurde auf die Messung der Absorption bei 280 nm verzichtet und nur der Filterbindungstest (siehe 3.2.1) durchgeführt. Aufgrund des Filterbindungstestes wurden die Puffer-R3- und Puffer-R4-Fraktionen je unter sich vereinigt, als Sammelfraktionen-R3 und -R4 bezeichnet und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.1.4 FPLC-Anionentauscherchromatographie

Zur weiteren Auftrennung der Sammelfraktionen-R3 und -R4 (siehe 3.1.3) wurde das Pharmacia FPLC-System mit einer Mono Q-Säule verwendet. Zur Herabsetzung der Salzkonzentration wurde die Sammelfraktion mit Puffer C viermal verdünnt und mit Hilfe eines "Superloop" auf die mit Puffer C voräquilibrierte Säule bei einem Fluss von 0,3 ml/min geladen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten aus Puffer C und Puffer D bei unverändertem Fluss (siehe Abb. 9). Die Absorption bei 280 nm wurde mit Hilfe eines Durchflussspektrometers aufgezeichnet. Mit dem Gilson Fraktionensammler wurden Durchbruch und Eluat in Fraktionen zu 8 Tropfen (240 µl) in einer albuminbehandelten Mikrotiterplatte gesammelt (siehe 3.3.5). Die Z-DNS-bindenden Fraktionen wurden mit dem Filterbin-

dungstest ermittelt (siehe 3.2.1) und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

3.2 DNS-Bindungstests

3.2.1 Filterbindungstest

Beim Filterbindungstest bilden DNS-bindende Proteine mit radioaktiver DNS Komplexe, welche im Gegensatz zu freier radioaktiver DNS auf einer Nitrozellulose-Membran zurückgehalten werden. Unter Verwendung von radioaktiv markierter DNS in Z- oder in B- Konformation können spezifisch Z-DNS-bindende Proteine von anderen DNS-bindenden Proteinen unterschieden werden. Bei Beobachtung eines positiven Signales mit Z-DNS und B-DNS in derselben Fraktion kann jedoch nicht entschieden werden, ob ein einziges Protein vorliegt, das gleichzeitig Z-DNS und B-DNS bindet, oder ob zwei spezifisch Z-DNS- beziehungsweise B-DNS-bindende Proteine nebeneinander vorkommen.

Im Gegensatz zu den in der Literatur erwähnten Methoden (Riggs et al., 1970), wurde der Filterbindungstest in Gegenwart von 25 μg BSA durchgeführt (Puffer-R5). Der BSA-Zusatz verhinderte die unspezifische Adsorption von Z-DNS-bindenden Proteinen an die Membran. Dadurch konnte die Hintergrundreaktion erheblich gesenkt werden, während andererseits die Bindungsspezifität nicht beeinflusst wurde.

In einer Mikrotiterplatte wurden pro Delle 80 µl Puffer-R5 und 20 µl einer zu untersuchenden Proteinfraktion vorgelegt und anschliessend 100 µl einer radioaktiven DNS-Sonde (ca 1'000 cpm, spez. Aktivität ca 300 cpm/ng) in Puffer-R5 zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Platte während 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf wurde die Probe mit einer Minifold-Filtrierapparatur durch eine Nitrozellulose-Membran filtriert, welche vorher zweimal 10 min in Puffer-R2 äquilibriert worden war. Um freie radioaktive DNS auszuwaschen, wurde die Membran zweimal mit Puffer-R2 gespült. Nach dem Waschen wurde die Nitrozellulose-Membran der Apparatur entnommen, zwischen zwei Kleenex-Tüchlein getrocknet und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Um die DNS-Bindung der einzelnen Proteinfractionen zu bestimmen, wurde die Membran autoradiographiert oder im Szintillationszähler deren Radioaktivität mittels Cerenkov-Zählung gemessen. Die Schwärzung des autoradiographierten Röntgenfilmes wurde mit dem Mikro-ELISA-Automaten bei 595 nm quantifiziert.

3.2.2 Bindungstest nach Weintraub

Die in den Laboratorien von Weintraub entwickelte Methode (Bowen et al., 1980) erlaubt die Identifizierung von DNS-Bindungsproteinen nach elektrophoretischer Auftrennung in Polyacrylamidgelen. Nach der Elektrophorese werden die Gele beidseits mit einer

Nitrozellulose-Membran bedeckt und die Proteine durch Diffusion auf diese übertragen. Die eine der Membranen wird mit radioaktiver Z-DNS, die andere mit radioaktiver B-DNS inkubiert. Aufgrund der nachfolgenden Autoradiographie können Z-DNS-, B-DNS- und allgemein DNS-bindende Proteine identifiziert werden.

Der Test wurde gegenüber der Originalmethode nur geringfügig verändert. Die zu analysierende Proteinfraction wurde in Anwesenheit von SDS mittels Plattengelelektrophorese (siehe 3.4.4) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Um einen möglichst nativen Zustand der Proteine zu gewährleisten wurde die SDS-Behandlung während 3 min bei 37°C durchgeführt und das Gel nach der Elektrophorese in einem Renaturierungspuffer 3 h geschwenkt. Das Gel wurde anschliessend zwischen zwei Nitrozellulose-Membranen geklemmt und für 36-48 h in Transferpuffer gelegt. Darauf wurden die Membranen für den Bindungsversuch auf drei Seiten in einen Plastiksack eingeschweisst und je nach Grösse der Membran mit 4-7 ml einer Lösung von radioaktiver Z- oder B-DNS versetzt. Die in Bindungspuffer gelöste DNS wies eine Aktivität von 40'000-100'000 cpm/ml auf, bei einer spezifischen Aktivität der DNS von 300 cpm/ng. Der Plastiksack wurde ohne Luftblasen verschweisst und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die Membran sofort viermal 15 min in je 50 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Autoradiographie der Membran zeigte nach 24-48 h Signale von DNS-bindenden Proteinen. Die Molekulargewichte der autoradio-

graphierten Proteine wurden anhand von mitgeführten Markerproteinen bestimmt, welche durch Färbung der Gele mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht wurden. Gefärbt wurden sowohl die Restgele nach dem Transfer als auch frische Gele .

3.3 Weitere Methoden

3.3.1 Herstellung von Z-DNS

Zur Durchführung der DNS-Bindungstests (siehe 3.2) und der Affinitätschromatographie (siehe 3.1.3) wurde konformationsstabile Z-DNS benötigt. Diese wurde durch Bromierung von Poly(dG-dC)•poly(dG-dC) hergestellt (Möller et al., 1984). Die Z-Konformation wurde anhand des charakteristischen Spektrums des Circular dichroismus bestätigt.

3.3.2 Kinasierung

Die Kinasierung wurde zum Zwecke der Endmarkierung der DNS mit [^{32}P] durchgeführt (Maniatis et al., 1982). Poly(dG-dC)•poly(dG-dC) in B-Form und bromiertes Poly(dG-dC)•poly(dG-dC) in Z-Form wurden zuerst mit Ultraschall fragmentiert. Dazu wurde die DNS in Eis gekühlt und dreimal während 3 min mit Unterbrüchen

von jeweils 1 min beschallt. Das Gerät wurde bei maximaler Schallintensität auf einen "duty cycle" von zehn Prozent eingestellt, welches einer Gesamtbeschallung von 6 sek/min entspricht. Dadurch wurden DNS-Bruchstücke mit einer Länge von 100-800 Basenpaaren erhalten. Für die Markierung der Z-DNS wurde die Menge der T4-Polynukleotidkinase verdoppelt, um vergleichbare Aktivitäten zwischen Z-DNS und B-DNS zu erhalten. Zur Reinigung der markierten DNS wurde anstelle der Chloroform-Phenolextraktion mit anschließender Sephadex-G-50-Chromatographie eine Ionentauscher-Chromatographie mit SP-Sephadex-C-50 durchgeführt. Damit wurden spezifische Aktivitäten bis zu 5000 cpm/ng DNS erreicht. Die für die DNS-Bindungstests erforderliche spezifische Aktivität wurde mit unmarkierter, beschallter DNS eingestellt.

3.3.3 Immobilisierung von Z-DNS für die Affinitätschromatographie

Die Kopplung von bromiertem Poly(dG-dC)•poly(dG-dC) an Ultrogel AcA 44 wurde in Anlehnung an die Methode von Guigues und Leng (1976) durchgeführt. Mit einer Ausbeute von 20-30 Prozent konnten pro ml gequollenem Gelmaterial 100-200 µg Z-DNS immobilisiert werden. Das Gel wurde bei 4°C im Kühlschrank in Gegenwart von 0,05 % (Gew/Vol) Thimerosal gelagert.

3.3.4 Plattengelelektrophorese

Polyacrylamid-Gradientengele (7-20% Gew/Vol) wurden zu Platten von 10 cm Länge, 14,5 cm Breite und 1,5 mm Dicke gegossen (Laemmli, 1970). Die SDS-Behandlung der Proteine wurde auf 3 min bei 37°C beschränkt, um die Renaturierungsvoraussetzungen für den Bindungstest nach Weintraub zu verbessern. Die Molekulargewichte der denaturierten Proteine wurden anhand der relativen Wanderungsgeschwindigkeit im Vergleich zu mitgeführten Markerproteinen bestimmt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Die geringen Proteinmengen in den Fraktionen der Z-DNS-Affinitätschromatographie machten eine Miniaturisierung nötig. Dafür wurden 15-prozentige Minigele von 5 cm Länge, 8 cm Breite und 0,75 cm Dicke hergestellt und die Coomassie-Blau-Färbung durch die zehnmal empfindlichere Silber-Coomassie-Doppelfärbemethode ersetzt (Dzandu et al., 1984).

3.3.5 Behandlung adsorbierender Oberflächen

In Vorversuchen traten bei der Isolation der Proteine grosse Verluste durch Adsorption an alle möglichen Oberflächen auf. Deshalb wurden alle Oberflächen, mit denen die Proteine in Kontakt kamen, zuerst mit bovinem Serumalbumin beschichtet. Mikrotiterplatten, Reagenzröhrchen usw. wurden mit einer Lösung von 25 µg BSA/ml

bidestilliertem Wasser gefüllt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abgiessen der Lösung wurde zweimal mit bidestilliertem Wasser nachgespült und der Gegenstand getrocknet.

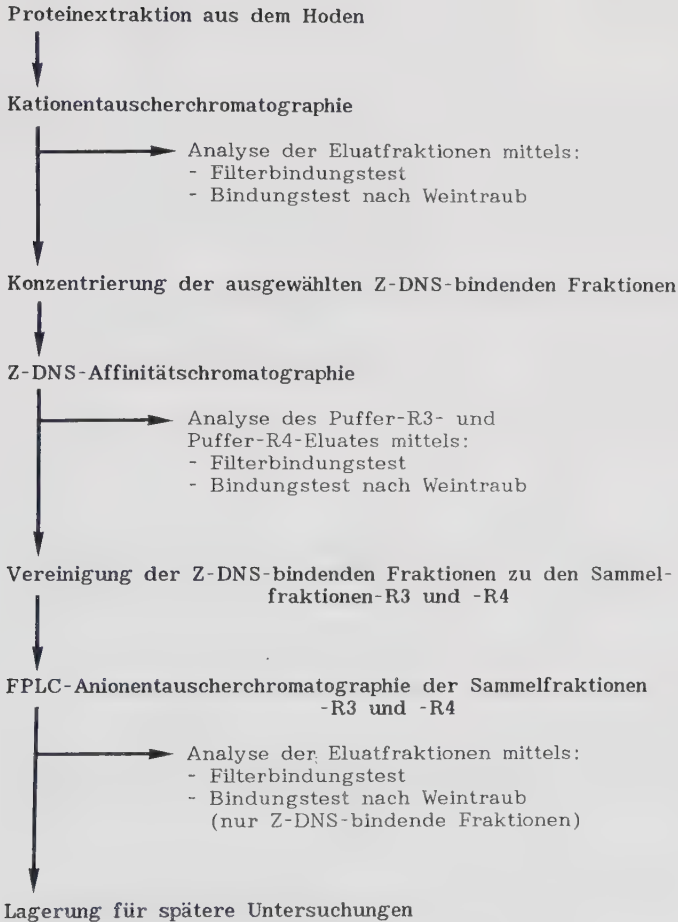
3.3.6 Konzentrierung der Proteine

Von allen geprüften Methoden bewährte sich die Ultrafiltration mit dem Mikrokonzentratoren Centricon 30 am besten. Dabei werden globuläre Moleküle mit nativen Molekulargewichten über 30 kD durch eine Membran zurückgehalten. Filtriergerät und Membranen wurden zur Vermeidung von Verlusten mit Serumalbumin vorbehandelt (siehe 3.3.5).

3.3.7 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit der von Bradford (1976) entwickelten Methode bestimmt. Die Analyse wurde mit dem kommerziell erhältlichen "Protein Assay" von Bio Rad durchgeführt. Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte in einem Mikro-ELISA-Automaten oder bei kleineren Probenzahlen im Spektrophotometer unter Verwendung von bovinem Serumalbumin als Standard.

3.4 Flussdiagramm der Proteinisolation



Kapitel 4

RESULTATE

4.1 Gewebeextrakt

In Vorversuchen wurde das Gewebe mit 1 M NaCl extrahiert. Die nachfolgenden DNS-Bindungstests zeigten immer starke B- und Z-Bindung. Der Bindungstest nach Weintraub wies darauf hin, dass die Bindung vorwiegend durch Histone bedingt war. Die Verringerung der Salzkonzentration auf 0,35 M NaCl brachte eine Abnahme dieser unspezifischen DNS-Bindung (nicht gezeigt). Deswegen wurde in der Folge mit der niedrigen Salzkonzentration extrahiert.

4.2 Kationentauscherchromatographie

Nach der Chromatographie des Gewebeextraktes auf CM-Trisacryl M wurde das in Abbildung 2 dargestellte Proteinprofil beobachtet. Unter den angewandten Bedingungen erschienen 90 Prozent der aufgetragenen Proteinmenge im Durchbruch. Die restlichen 10 Prozent wurden mit 1 M NaCl ausgewaschen. Eine nachträgliche Erhöhung der Salzkonzentration auf 2 M NaCl führte zu keiner weiteren Elution von Proteinen. In den obersten 2 cm der Chromatographiematrix bildete sich ein beiger Niederschlag. Dieser bestand, wie spätere Untersuchungen bewiesen, aus präzipitierten Histonproteinen (nicht gezeigt).

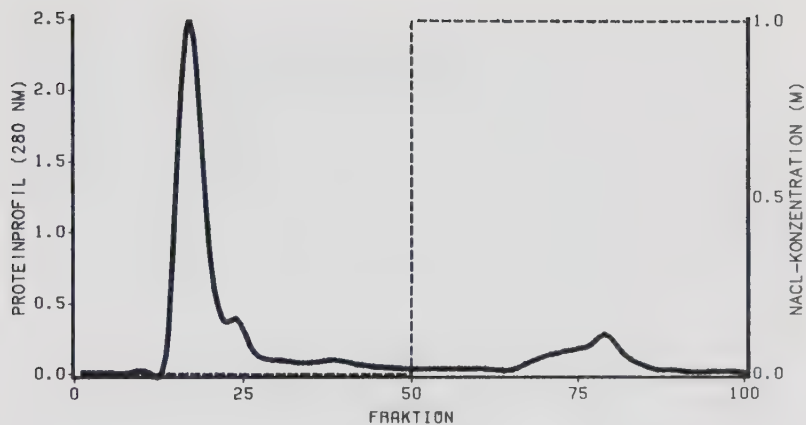


Abb. 2: Kationentauscherchromatographie: Proteinprofil.

— Absorption bei 280 nm
 - - - NaCl-Konzentration

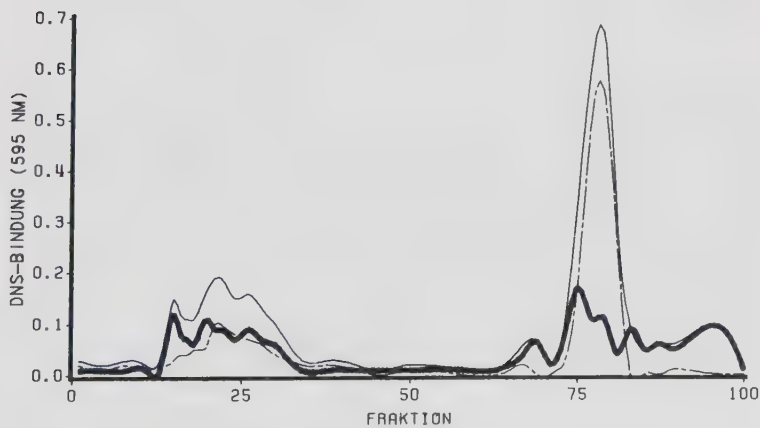


Abb. 3: Kationentauscherchromatographie: Filterbindungstest.

— Differenz der DNS-Bindung (Z minus B)
 — Z-DNS-Bindung der Fraktionen
 - - - B-DNS-Bindung der Fraktionen

Im Filterbindungstest (Abb. 3) zeigten die meisten Fraktionen eine wenig spezifische DNS-Bindung, die ungefähr parallel zum Proteinprofil verlief. Das Verhältnis der DNS-Bindung zur Proteinkonzentration war jedoch in den 1 M NaCl-Eluatfraktionen (Fraktionen 72 - 81) etwa vierzigmal höher als im Durchbruch. Die Z-DNS-Bindung war im Vergleich zur B-DNS-Bindung (Differenz) in keiner Fraktion deutlich erhöht, sodass eine Auswahl der Z-DNS-bindenden Fraktionen aufgrund des Filterbindungstestes nicht möglich war.

Der Bindungstest nach Weintraub (Abb. 4 und 5) zeigte in den Fraktionen 15 - 29 (Durchbruch) und 65 - 81 (1 M NaCl-Eluat) mehrere DNS-bindende-Proteine. Einzelne davon banden bevorzugt Z-DNS, andere B-DNS oder verhielten sich gegenüber Z- und B-DNS unspezifisch. Die beobachtete Durchmischung verschiedener Proteine erklärte die geringe Aussagekraft des Filterbindungstestes (siehe oben). Bevorzugt Z-DNS-bindende Proteine wurden einzig in den Fraktionen 76 - 78 gefunden. Ihre scheinbaren Molekulargewichte betrugen 29, 31, 38, 58 und 85kD (siehe dazu aber Kapitel 4.3). Ihre Konzentrationen waren so niedrig, dass die Proteine mit der Coomassie-Blau-Färbung kaum sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 5).

Anhand des Bindungstestes nach Weintraub wurden die Fraktionen 76 - 78 des 1 M NaCl-Eluates zur weiteren Verarbeitung ausgewählt.

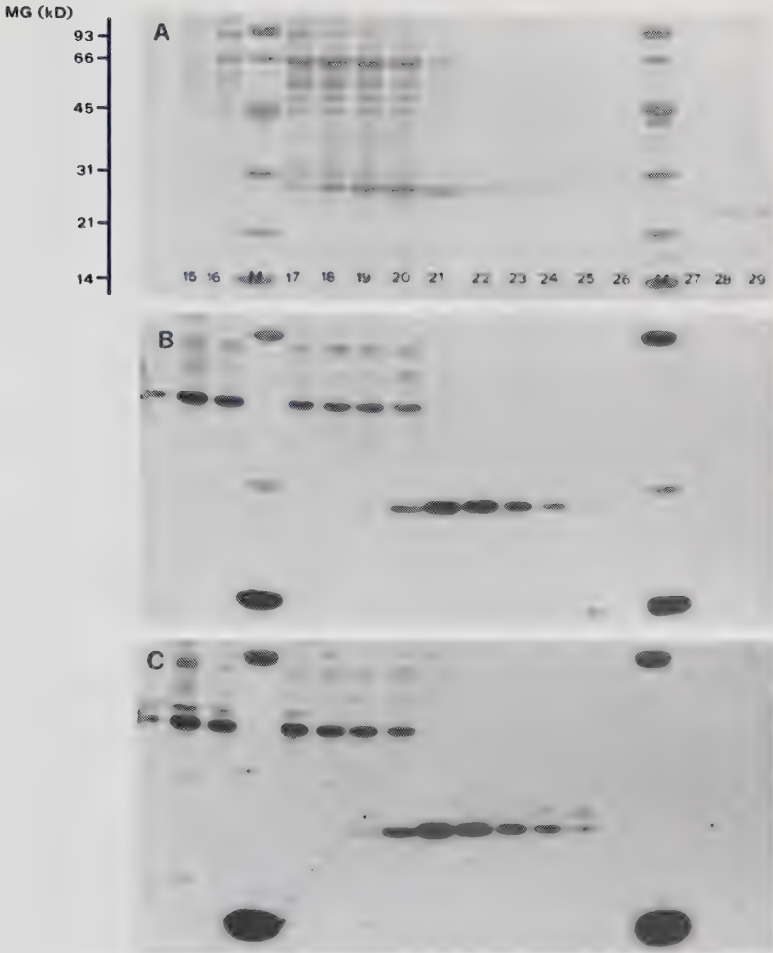


Abb. 4: Kationentauscherchromatographie:
Bindungstest nach Weintraub (Fraktionen 15 - 29).
 A : Proteinprofil (Coomassie-Blau-Färbung des Gels)
 B : Z-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 C : B-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 Die Zahlen bezeichnen die Chromatographiefractionen
 M = MG-Markerproteine (MG siehe linker Bildrand)

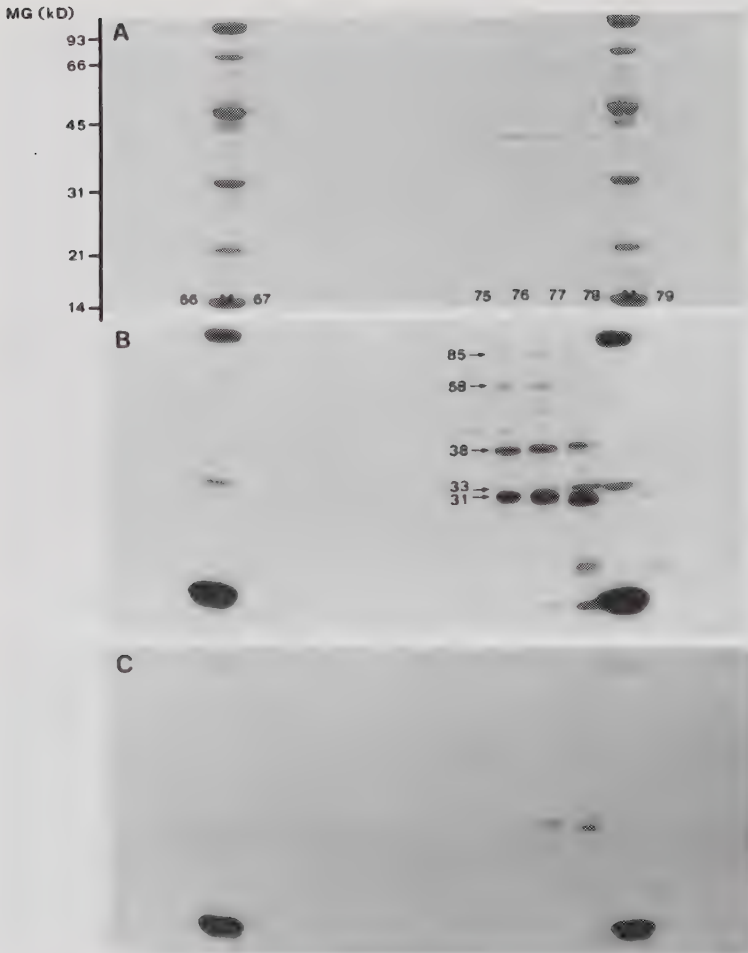


Abb 5 Kationentauscherchromatographie:
 Bindungstest nach Weintraub (Fraktionen 66 - 79).
 A : Proteinprofil (Coomassie-Blau-Färbung des Geles)
 B : Z-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 C : B-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 Die Zahlen bezeichnen die Chromatographiefraktionen
 M = MG-Markerproteine (MG siehe linker Bildrand)
 → : Z-DNS-bindende Proteine

4.3 Z-DNS-Affinitätschromatographie

Zur weiteren Reinigung der Z-DNS-bindenden Proteine in den Fraktionen 76 - 78 der Kationentauscherchromatographie (siehe 4.2) wurde eine Affinitätschromatographie an immobilisierter Z-DNS durchgeführt (Abb. 6). Die stufenweise Elution ergab im Filterbindungstest zwei Fraktionengruppen, welche ausschliesslich Z-DNS banden. Die erste wurde mit 0,25 M, die zweite mit 1 M NaCl eluiert.

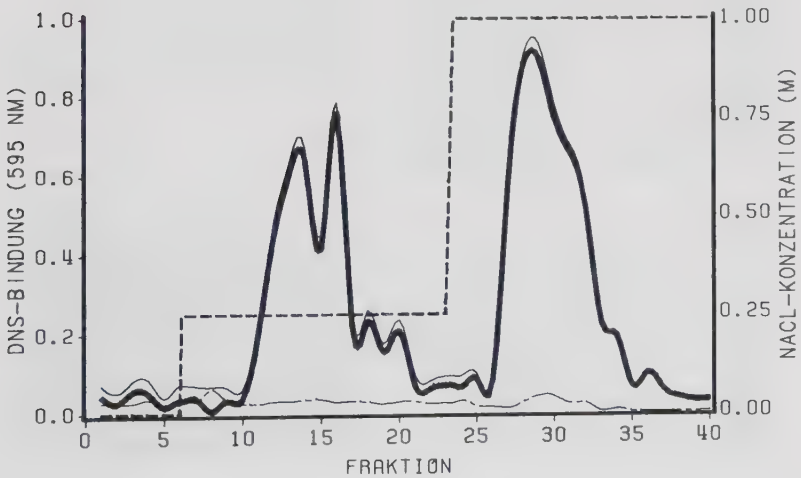


Abb. 6: Z-DNS-Affinitätschromatographie: Filterbindungstest.

- Differenz der DNS-Bindung (Z minus B)
- - - Z-DNS-Bindung der Fraktionen
- - - B-DNS-Bindung der Fraktionen
- . - . NaCl-Konzentration

In der ersten Fraktionengruppe (Fraktionen 11 - 17) wurden mit dem Bindungstest nach Weintraub 3 Proteine mit bevorzugter Affinität für Z-DNS identifiziert. Ihre scheinbaren Molekulargewichte betrugen 31, 33 und 58 kD (Abb. 7). Das 58kD-Protein und das 31kD-Protein schienen sich vor dem 33kD-Protein von der Z-DNS-Affinitätsmatrix zu lösen.



Abb. 7: Z-DNS-Affinitätschromatographie: Bindungstest nach Weintraub (Fraktionen 12 - 16).
 A : Proteinprofil (Silber-Coomassie-Blau gefärbtes Gel)
 B : Z-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 C : B-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 → : Z-DNS-bindende Proteine
 MG-Markerproteine: 93, 66, 45, 31, 21 und 14 kD.

Die 3 Proteine waren gegenüber dem Ausgangsmaterial (Fraktion 77 der Kationentauscherchromatographie) leicht angereichert. Alle Fraktionen enthielten jedoch noch Verunreinigungen mit nicht DNS-bindenden Proteinen (vgl. Abb. 7A und 7B). In allen Fraktionen konnte eine Bande bei 66 kD beobachtet werden. Diese Bande trat nicht auf, wenn die Auffanggefäße nicht mit bovinem Serumalbumin vorbehandelt wurden. Daraus wurde geschlossen, dass es sich um eine sekundäre Kontamination mit diesem Protein handelte.

Die zweite Fraktionengruppe (Fraktionen 27-31) zeigte im Bindungstest nach Weintraub nur noch zwei Proteine mit bevorzugter Affinität für Z-DNS (Abb. 8). Ihre scheinbaren Molekulargewichte betrugen 31 und 33 kD. Infolge der geringen Proteinkonzentration wurde das Doppelte des üblichen Probevolumens auf das Polyacrylamidgel geladen. Als Nachteil musste eine verminderte Auflösung des Trennverfahrens in Kauf genommen werden. Deswegen sind in der Abbildung 8B die beiden Proteine mit einem Molekulargewicht von 31 und 33 kD nicht mehr als einzelne Banden sichtbar. Auch in dieser Fraktionengruppe trat bei Färbung mit Silber-Coomassie-Blau wieder die Proteinbande bei 66 kD auf, welche einer sekundären Verunreinigung mit bovinem Serumalbumin entspricht (siehe vorher).

Aufgrund des Filterbindungstestes wurden die Fraktionen 12 - 16 einerseits und die Fraktionen 27 - 31 andererseits zu den Sammelfraktionen-R3 und -R4 vereinigt.

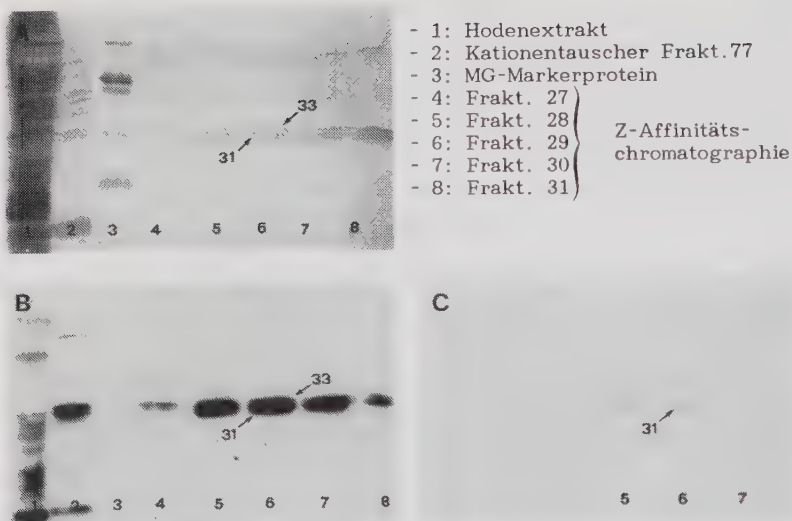


Abb. 8: Z-DNS-Affinitätschromatographie:
Bindungstest nach Weintraub (Fraktionen 27 - 31).
 A : Proteinprofil (Silber-Coomassie-Blau gefärbtes Gel)
 B : Z-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 C : B-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)
 → : Z-DNS-bindende Proteine
 MG-Markerproteine: 93, 66, 45, 31, 21 und 14 kD.

4.4 FPLC-Anionentauscherchromatographie

Die Sammelfraktionen-R3 und -R4 wurden getrennt weiterverarbeitet. Sie wurden auf eine Mono Q-Säule des FPLC-Systems geladen und mittels eines Salzgradienten aufgetrennt.

4.4.1 Sammelfraktion-R3

Das Proteinprofil der Sammelfraktion-R3 wies vier deutliche Peaks auf (Abb. 9).

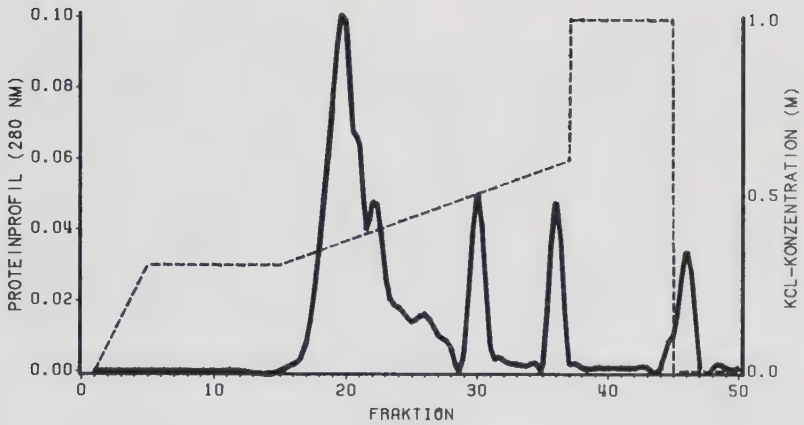


Abb. 9: FPLC-Anionentauscherchromatographie der Sammel-fraktion-R3 : Proteinprofil.

— Absorption bei 280 nm
- - - KCl-Konzentration

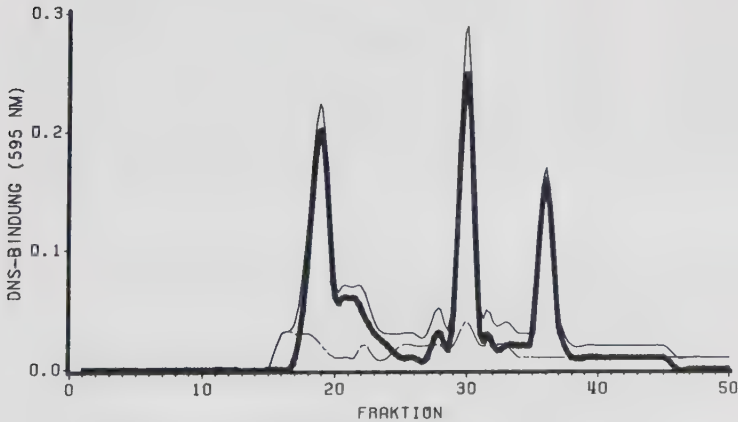


Abb. 10: FPLC-Anionentauscherchromatographie der Sammel-fraktion-R3 : Filterbindungstest.

— Differenz der DNS-Bindung (Z minus B)
- - - Z-DNS-Bindung der Fraktionen
- - - B-DNS-Bindung der Fraktionen

Der erste dieser Peaks war aus mehreren Komponenten zusammengesetzt. Eine anschliessende Elution der Säule mit 2 M KCl ergab keine weiteren Peaks (nicht gezeigt).

Im Filterbindungstest wurden 3 Fraktionengruppen mit bevorzugter Affinität für Z-DNS gefunden. Sie stimmten in ihrer Lage mit den ersten drei Peaks des Proteinprofils überein (Abb. 10).

Der Bindungstest nach Weintraub wurde mit den Spitzenfraktionen 19, 30 und 36 durchgeführt (Abb. 11).

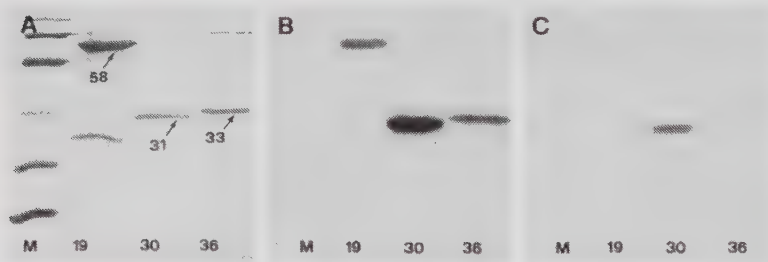


Abb. 11: FPLC-Anionentauscherchromatographie der Sammel-fraktion-R3 : Bindungstest nach Weintraub der Fraktionen 19, 30 und 36.

A : Proteinprofil (Silber-Coomassie-Blau gefärbtes Gel)

B : Z-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)

C : B-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)

→ : Z-DNS-bindende Proteine

M = MG-Markerproteine: 93, 66, 45, 31, 21 und 14 kD.

Fraktion 19 enthielt das 58kD-Protein in stark angereicherter Form. Es war jedoch noch immer mit verschiedenen Proteinen verunreinigt.

Seine Affinität für Z-DNS schien jedoch weitgehend spezifisch zu sein. Fraktion 30 enthielt das 31kD-Protein. Es war lediglich mit bovinem Serumalbumin aus der Mikrotiterplatte kontaminiert. Es band unter den angewandten Bedingungen neben Z-DNS auch B-DNS, allerdings mit geringerer Affinität. Fraktion 36 beinhaltete das reine 33kD-Protein neben kleinen Mengen von bovinem Serumalbumin (siehe oben). Im Gegensatz zu dem 31kD-Protein band es ausschliesslich Z-DNS.

4.4.2 Sammelfraktion-R4

In der Sammelfraktion-R4 konnten im Proteinprofil vier Peaks festgestellt werden (Abb. 12). Der erste Peak war zehnmal kleiner als der erste Peak der Sammelfraktion-R3 und erschien 7 Fraktionen früher. Die drei anderen Peaks eluierten jedoch bei gleicher Ionenstärke (vgl. Abb. 9 und 12).

Der Filterbindungstest wies zwei Fraktionengruppen auf, welche fast ausschliesslich Z-DNS banden (Abb. 13). Diese deckten sich in ihrer Lage mit dem zweiten und dritten Peak des Proteinprofiles (Abb. 12). Im Bereich des ersten Peaks des Proteinprofiles konnte eine schwache Z-DNS-Bindung festgestellt werden, welche aber nur geringfügig über der Hintergrundsreaktion lag.

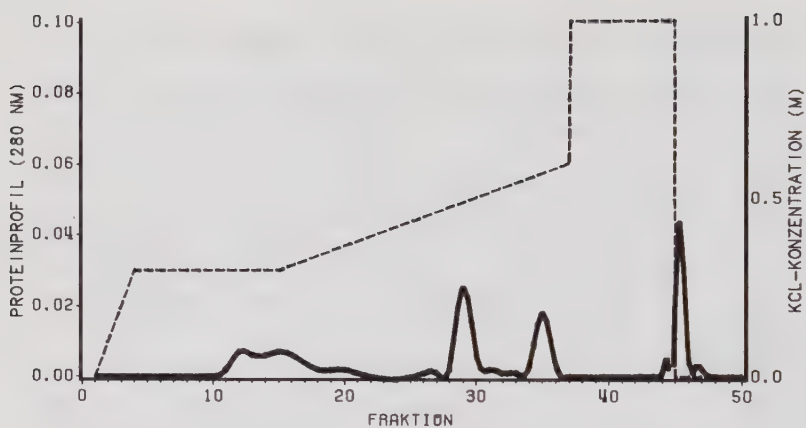


Abb. 12: FPLC-Anionentauscherchromatographie der Sammel-fraktion-R4 : Proteinprofil.

— Absorption bei 280 nm
 --- KCl-Konzentration

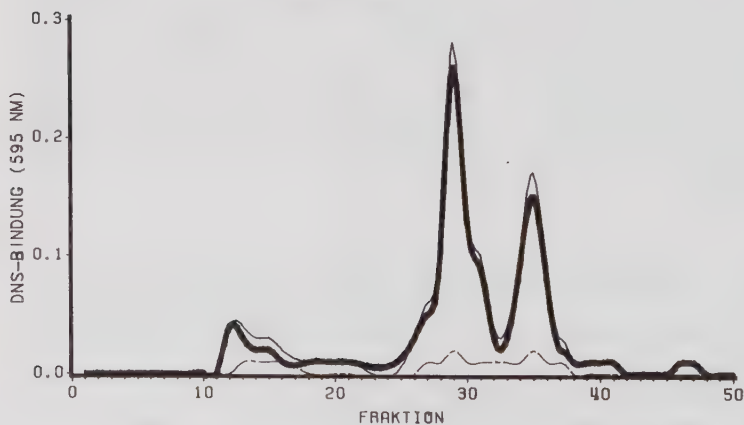


Abb. 13: FPLC-Anionentauscherchromatographie der Sammel-fraktion-R4 : Filterbindungstest.

— Differenz der DNS-Bindung (Z minus B)
 --- Z-DNS-Bindung der Fraktionen
 ... B-DNS-Bindung der Fraktionen

Für den Bindungstest nach Weintraub wurden anhand des Filterbindungstestes die Spitzenfraktionen 12, 29 und 35 des Proteinprofils ausgewählt (Abb. 14).

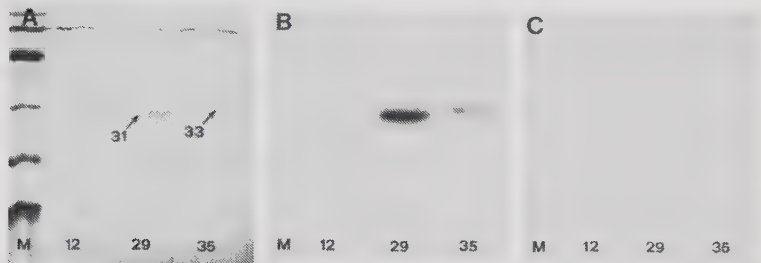


Abb. 14: FPLC-Anionentauscherchromatographie der Sammelfraktion-R4 : Bindungstest nach Weintraub der Fraktionen 12, 29 und 35.

A : Proteinprofil (Silber-Coomassie-Blau gefärbtes Gel)

B : Z-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)

C : B-DNS-Bindung (Autoradiographie der Membran)

→ : Z-DNS-bindende Proteine

M = MG-Markerproteine: 93, 66, 45, 31, 21 und 14 kD.

In der Fraktion 12 war ausser der feinen Bande des bovinen Serumalbumins, welches für die Vorbehandlung der Mikrotiterplatte verwendet worden war, keine weitere Proteinbande zu erkennen. Im Bindungstest nach Weintraub war nicht festzustellen, was die Ursache der leichten Z-DNS-Bindung im Filterbindungstest gewesen war. Fraktion 29 beinhaltete neben bovinem Serumalbumin das reine

31kD-Protein. Es band im Gegensatz zum 31kD-Protein in Fraktion 30 der Sammelfraktion-R3 (Abb. 11) nur Z-DNS. Fraktion 35 enthielt das reine 33kD-Protein in kleinen Mengen, daneben wenig bovines Serumalbumin. Das 33kD-Protein band ausschliesslich Z-DNS. Aufgrund des Bindungstestes nach Weintraub schien seine Affinität zu Z-DNS etwas geringer zu sein als diejenige des 31kD-Proteines aus der Fraktion 29.

Kapitel 5

DISKUSSION

Meine Aufgabe war es, Z-DNS-bindende Proteine in Säugetiergewebe nachzuweisen und wenn möglich zu isolieren. Bei der Wahl des Organes lies ich mich von der Beobachtung leiten, dass Antikörper gegen Z-DNS bei der immunhistologischen Untersuchung des Rattenhodens das Vorhandensein von Z-DNS andeuteten (Morgenegg et al., 1985). Besonders die Zellkerne der Spermatogonien reagierten stark mit dem Antikörper. Obwohl Z-DNS-Immunreaktivität auch in anderen Geweben der Ratte nachweisbar war, blieb sie in ihrer Intensität doch deutlich geringer als die im Hoden. Es wurde spekuliert, dass die Anwesenheit von Z-DNS auch das Vorliegen von Z-DNS-bindenden Proteinen widerspiegeln könnte. Deswegen wählte ich Hodengewebe als Ausgangsmaterial für die Isolierung Z-DNS-bindender Proteine. Aus quantitativen Gründen wurde nicht der Hoden von Ratten, sondern der von Stieren untersucht.

Bei der Proteinisolation stellten anfänglich Histone das grösste Problem dar. Ihre unspezifische, aber hochaffine Bindung an DNS (Mura & Stollar, 1984) bewirkte in den beiden Bindungstests so starke Signale, dass die Erkennung kleiner Mengen spezifisch Z-DNS-bindender Proteine nicht möglich war. Das Problem konnte

schliesslich durch zwei Massnahmen gelöst werden. Erstens wurde die Extraktion bei niedriger Salzkonzentration (0,35 M NaCl) durchgeführt, wobei ein Grossteil der Histone im Gewebe zurück blieb. Zweitens wurde daran eine Kationentauscherchromatographie angeschlossen, bei welcher die Histone auf der Säule irreversibel adsorbiert wurden. Auf diese Weise konnten die Histone weitgehend abgetrennt werden.

An die Kationentauscherchromatographie wurde zur weiteren Reinigung eine Z-DNS-Affinitätschromatographie angeschlossen. Dadurch liessen sich beträchtliche Mengen von Nicht-Z-DNS-bindende Proteinen abtrennen. Das zeigte sich bei einem Versuch, die Z-DNS-Affinitätschromatographie bei der Reinigung zu überspringen. Das Proteinprofil der nachfolgenden FPLC-Anionentauscherchromatographie zeigte ab Fraktion 45 einen hohen Peak, in dem keine Z-DNS-Bindung nachweisbar war (nicht dargestellt). Die Effizienz der Reinigung ergab sich auch aus dem Vergleich der gefärbten Polyacrylamidgele des Puffer-R3- (0,25 M NaCl, Abb. 7A) und des Puffer-R4-Eluates (1 M NaCl, Abb. 8A). Die unspezifisch an die Z-DNS gebundenen Proteine erschienen bereits im 0,25M-Eluat, während das 1M-Eluat nur noch zwei Z-DNS-bindende Proteine (31kD und 33kD) in weitgehend reiner Form enthielt. Zusätzlich führte die Affinitätschromatographie zu einer ungefähr zehnfachen Anreicherung der Z-DNS-bindenden Proteine. Eigenartigerweise wurden aber zwei Z-DNS-bindende Proteine von 38 und

85 kD (Abb. 5B) von der Z-DNS-Affinitätssäule nicht zurückgehalten und gingen verloren (Abb. 7B und 8B).

Die aus der Z-DNS-Affinitätschromatographie gewonnenen Sammelfraktionen-R3 (0,25 M NaCl) und -R4 (1 M NaCl) wurden mit Hilfe einer FPLC-Anionentauscherchromatographie weiter aufgetrennt. Die *Sammelfraktion-R3* ergab dabei vier Peaks (Abb. 9), von denen die beiden mittleren aus einer einzigen Proteinkomponente bestanden (Abb. 11). Peak 2 (Fraktion 30) entsprach einem 31kD-Protein, Peak 3 (Fraktion 36) einem 33kD-Protein. Das 31kD-Protein band bevorzugt Z-DNS, daneben aber auch geringfügig B-DNS (Abb. 10 und 11). Das 33kD-Protein schien jedoch Z-DNS spezifisch zu binden. Mit dem gewählten Salzgradienten liess sich ein weiteres Z-DNS-bindendes Protein von Molekulargewicht 58 kD im ersten Peak (Fraktion 19) anreichern, jedoch nicht sauber darstellen (Abb. 9 und 11). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine weitere Reinigung dieses Proteines verzichtet. Die *Sammelfraktion-R4* wurde durch die FPLC-Anionentauscherchromatographie ebenfalls in vier Peaks aufgelöst (Abb. 12). Dabei stimmten Peak 2 und 3 in ihrer Lage mit den entsprechenden Peaks aus der *Sammelfraktion-R3* überein (vgl. Abb. 9 und 12). Peak 2 (Fraktion 29) enthielt ein 31kD-Protein, Peak 3 (Fraktion 35) ein 33kD-Protein in anscheinend homogener Form. Beide Proteine schienen Z-DNS spezifisch zu binden (Abb. 13 und 14).

Die 31kD- und 33kD-Proteine waren nach der FPLC-Anionentauscherchromatographie bis auf die Anwesenheit kleiner Mengen von bovinem Serumalbumin (BSA) anscheinend rein. Das BSA stammte aus den Geräten und Auffanggefäßen, welche mit diesem Protein vorbehandelt worden waren (siehe 3.3.5). Die Kontamination mit BSA war nicht zu umgehen, da die Z-DNS-bindenden Proteine durch Adsorption vollständig verloren gingen, wenn auf die Beschichtung der Geräte mit BSA verzichtet wurde. Die Anwesenheit von BSA kam jedoch als Ursache für die Z-DNS- und B-DNS-Bindung in den verschiedenen Fraktionen nicht in Frage, da BSA nachweislich weder im Filterbindungstest (nicht gezeigt) noch im Bindungstest nach Weintraub DNS bindet. Letzteres geht eindeutig aus dem Fehlen von Signalen im Markerproteingemisch hervor, welches authentisches BSA als Markerprotein von 66 kD enthält (zB. Abb. 11 und 14).

Aus den Sammelfraktionen-R3 (0,25M-Eluat der Z-DNS-Affinitätschromatographie) und -R4 (1M-Eluat) wurde mittels FPLC-Anionentauscherchromatographie je ein 31kD- und 33kD-Protein isoliert. Diese werden in der Folge als 31kD(0,25M)- und 33kD(0,25M)-Protein, beziehungsweise 31kD(1M)- und 33kD(1M)-Protein bezeichnet. Es ist beim gegenwärtigen Stand der Analytik nicht abschliessend zu entscheiden, ob die beiden 31kD- und die beiden 33kD-Proteine identisch sind. Für Identität sprechen die gleichen Molekulargewichte und das gleiche Chromatographieverhalten in der

FPLC-Anionentauscherchromatographie (vgl. Abb. 9 und 12). Gegen Identität spricht die Beobachtung, dass die 31kD(0,25M)- und 33kD(0,25M)-Proteine schon bei einer Salzkonzentration von 0,25 M von der Z-DNS-Affinitätsmatrix losgelöst wurden, die 31kD(1M)- und 33kD(1M)-Proteine jedoch erst bei 1 M NaCl. Das deutet darauf hin, dass die Hochsalzproteine eine höhere Affinität zur Z-DNS besitzen als die entsprechenden Niedersalzproteine. Aus den Abbildungen 9, 10, 12 und 13 lässt sich das Ausmass der Z-DNS-Bindung im Verhältnis zur Proteinkonzentration annähernd errechnen. In Uebereinstimmung mit der obigen Aussage ergibt sich, dass die Hochsalzproteine eine etwa 2,5 bis 3 mal stärkere Affinität zu Z-DNS aufweisen als die Niedersalzproteine. Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass die Filterbindungstests der Abbildung 10 und 13 nicht gleichzeitig auf einer Nitrozellulose-Membran durchgeführt wurden. Meine Erfahrungen zeigen nämlich, dass erhebliche Unterschiede in der Proteinbindung von Membran zu Membran bestehen, sodass echte quantitative Vergleiche nur zwischen parallel behandelten Proben zulässig sind.

Die Hypothese von verwandten, aber nicht identischen 31kD-Proteinen wird auch durch den Bindungstest nach Weintraub gestützt. Das 31kD(0,25M)-Protein band neben Z-DNS auch geringfügig B-DNS (Abb. 11). Im Gegensatz dazu band das 31kD(1M)-Protein nur Z-DNS (Abb. 14). Allerdings wurde der Bindungstest der Abbildung 11 mit einer höheren Proteinmenge

durchgeführt als derjenige der Abbildung 14. Es ist deshalb möglich, dass beim Angleichen der beiden Proteinkonzentrationen auch beim 31kD(1M)-Protein eine leichte B-DNS-Bindung zum Vorschein gekommen wäre. Dieses Experiment konnte wegen Materialmangels nicht durchgeführt werden. Die beiden 33kD-Proteine (0,25 M bzw. 1 M) liessen sich hingegen aufgrund der Z-DNS-Bindungsspezifität nicht unterscheiden. Beide banden scheinbar ausschliesslich Z-DNS (Abb. 11 und 14).

Die Spezifität der Proteine in Bezug auf Z-DNS-Bindung ist aufgrund des Filterbindungstests und des Bindungstests nach Weintraub nicht eindeutig bestimmbar. Die Aussagekraft des Bindungstestes nach Weintraub ist besonders problematisch, da die Proteine vor der Inkubation mit der DNS-Sonde in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Hinzu kommt, dass die Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert werden, bevor sie eine DNS-Bindung eingehen können. Es ist zu vermuten, dass aus diesen beiden Gründen die Proteine während der DNS-Bindung nicht mehr in nativem Zustand vorliegen, wodurch die Bindungsspezifität verändert werden könnte.

Eine verlässliche Aussage über die DNS-Bindungsspezifität ist nur durch exakte Bestimmung der Affinitätskonstanten für Z- und B-DNS möglich. Ausserdem wird zu beweisen sein, dass die Bindung der Proteine an Z-DNS wirklich konformationsabhängig ist und nicht auf der Erkennung der Bromsubstituenten an

Poly(dG-dC)•poly(dG-dC) beruht. Dafür wird es notwendig sein, auch andere unter physiologischen Bedingungen stabile Z-DNS-Formen heranzuziehen, zum Beispiel das Poly(dG-dC)•poly(dG-dC) dienPt(0.12) und das Poly(dG-m⁵dC)•poly(dG-m⁵dC), welches in Anwesenheit von 3 mM Mg²⁺ und 50 mM NaCl vollständig in Z-Konformation vorliegt (Behe & Felsenfeld, 1981). Als weiterer Beweis für die spezifische Bindung der Proteine an Z-DNS könnte die chemische "Footprint"-Methode herangezogen werden (Runkel & Nordheim, 1986). Bei dieser Methode wird ein zu prüfendes Protein an ein Plasmid gebunden, welches eine Region mit Z-Struktur enthält. Anschliessend wird die Bindungsstelle auf dem Plasmid durch chemische Sequenzierung lokalisiert. Das Resultat erlaubt eine Aussage darüber, ob das Protein spezifisch an eine Z-Region, B-Region, B-Z-Uebergangsregion oder konformationsunabhängig an DNS bindet.

Abschliessend kann gesagt werden, dass zwei Z-DNS-bindende Proteine von 31 kD und 33 kD in nativem Zustand und anscheinend homogener Form isoliert wurden. Ein drittes Z-DNS-bindendes Protein von 58 kD wurde stark angereichert. Die genaue Charakterisierung und Identifizierung der Proteine wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Kapitel 6

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Hoden geschlechtsreifer Stiere wurden zwei Z-DNS-bindende Proteine mit den scheinbaren Molekulargewichten 31'000 (31kD-Protein) und 33'000 (33kD-Protein) in homogener Form und nativem Zustand isoliert. Ein drittes Z-DNS-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 58'000 (58kD-Protein) wurde stark angereichert. Die Isolation der Proteine erfolgte durch Extraktion von Hodengewebe mit 0,35 M NaCl und nachfolgender Fraktionierung mittels dreier Chromatographieverfahren (Kationentauscher-, Z-DNS-Affinitäts- und FPLC-Anionentauscherchromatographie). Die konformationsabhängige DNS-Bindung der Fraktionen wurde mit Hilfe des Filterbindungstestes und des Bindungstestes nach Weintraub überwacht. Letzterer besteht in der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen mit anschließender Renaturierung, Uebertragung auf eine Nitrozellulose-Membran und Inkubation mit Z-DNS-[bromiertes Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)] beziehungsweise B-DNS-Sonden [Poly(dG-dC)•poly(dG-dC)]. Auf diese Weise gelang die Isolierung der erwähnten spezifisch Z-DNS-bindenden Proteine. Ihre weitere Charakterisierung wird möglicherweise Einblicke in die bis heute noch unbekannte biologische Funktion der Z-DNS gewähren.

Kapitel 7

LITERATURVERZEICHNIS

Aiken J.M., Miller F.D., Hagen F., McKenzie D.I., Krawetz S.A.,

Van de Sande J.H., Rattner J.B. & Dixon H.G. (1985)

Tandem repeats of a specific alternating purine-pyrimidine DNA
sequence adjacent to protamine genes in the rainbow trout that can
exist in the Z form

Biochemistry 24, 6268-6276

Azorin F., Hahn R. & Rich A. (1984)

Restriction endonucleases can be used to study B-Z junctions in
supercoiled DNA

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 5714-5718

Azorin F. & Rich A. (1985)

Isolation of Z-DNA binding proteins from SV 40 minichromosomes:
Evidence for binding to the viral control region

Cell 41, 365-374

Behe M. & Felsenfeld G. (1981)

Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z transition in poly(dG-m⁵dC)•poly(dG-m⁵dC)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 1619-1623

Boiteux S., Costa de Oliveira R. & Laval J. (1985)

The Escherichia coli O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase does not repair promutagenic O⁶-methylguanine residues when present in Z-DNA

J.Biol.Chem. 260, 8711-8715

Bowen B., Steinberg J., Laemmli U.K. & Weintraub H. (1980)

The detection of DNA-binding proteins by protein blotting

Nucleic Acids Res. 8, 1-20

Bradford M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding

Anal.Biochem. 72, 248-254

Butzow J.J., Shin Y.A. & Eichhorn G.L. (1984)

Effect of template conversion from the B to the Z conformation on the RNA polymerase activity

Biochemistry 23, 4837-4843

Crawford J.L., Kolpak F.J., Wang A.H.-J., Quigley G.J., van Boom J.H., van der Marel G. & Rich A. (1980)

The tetramer d(CpGpCpG) crystallizes as a left-handed double helix
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 4016-4020

Di Capua E., Stasiak A., Koller T., Brahms S., Thomae R. & Pohl F.M. (1983)

Torsional stress induces left-handed helical stretches in DNA of natural base sequence: circular dichroism and antibody binding
EMBO J. 2, 1531-1535

Dzandu J.K., Deh M.E., Barrat D.L. & Wise G.E. (1984)

Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins and lipids in the same polyacrylamid gel using a double-staining technique

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 1733-1737

Guigues M. & Leng M. (1976)

Antibodies to poly(I)•poly(C)

Eur.J.Biochem. 69, 615-624

Hayes T.E. & Dixon J.T. (1985)

Z-DNA in the rat somatostatin gene

J.Biol.Chem. 260, 8145-8156

Herr W. (1985)

Diethyl pyrocarbonate : A chemical probe for secondary structure
in negatively supercoiled DNA

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 8009-8013

Hill R.J. & Stollar B.D. (1983)

Dependence of Z-DNA antibody binding to polytene chromosomes on
acid fixation and DNA torsional strain

Nature (London) 305, 338-340

Kitayama S., Sousa R., Rosen B., Hsu A. & Rich A. (1985)

A Z-DNA binding protein isolated from D.radiodurans

Biochem.Biophys.Res.Comm. 130, 1294-1300

Kmiec E.B. & Holloman W.K. (1982)

Homologous pairing of DNA molecules promoted by a protein from
Ustilago

Cell 29, 367-374

Kmiec E.B., Angelides K.J. & Holloman W.K. (1985)

Left handed DNA and the synaptic pairing reaction promoted by
Ustilago Rec 1 protein

Cell 40, 139-145

Kuenzle C.C., Heizmann C.W., Hübscher U., Hobi R., Winkler G.C., Jaeger A.W. & Morgenegg G. (1983)

Chromatin changes accompanying neuronal differentiation

Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 48, 493-499

Laemmli U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature (London) 227, 680-685

Lafer E.M., Möller A., Nordheim A., Stollar B.D. & Rich A. (1981)

Antibodies specific for left-handed Z-DNA

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 3546-3550

Lafer E.M., Sousa R., Rosen B., Hsu A. & Rich A. (1985)

Isolation and characterization of Z-DNA binding proteins from wheat germ

Biochemistry 24, 5070-5076

Lagravère F., Derbin C., Malfoy B., Leng M. & Laval J. (1984)

Ring-opened alkylated guanine is not repaired in Z-DNA

Nature (London) 310, 798-800

Lemeunier F., Derbin C., Malfoy B., Leng M. & Taillandier E.
(1982)

Identification of left handed Z-DNA by indirect immunofluorescence
in polytene chromosomes of *Chironomus thummi thummi*
Exp.Cell Res. *141*, 508-513

Lipps H.J., Nordheim A., Lafer E.M., Ammermann D., Stollar B.D.
& Rich A. (1983)

Antibodies against Z-DNA react with the macronucleus but not the
micronucleus of the hypotrichous ciliate *Stylonychia mytilus*
Cell *32*, 435-441

Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1982)

Molecular cloning. A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory *1982*, 124

Marx J.L. (1985)

Z-DNA : Still searching for a function
Science *230*, 794-796

Möller A., Nordheim A. & Rich A. (1984)

Bromination stabilizes poly(dG-dC) in the Z-DNA form under low-
salt conditions
Biochemistry *23*, 54-62

Morgenegg G., Celio M.R., Malfoy B., Leng M. & Kuenzle C.C.
(1983)

Z-DNA immunoreactivity in rat tissues

Nature (London) 303, 540-543

Mura C.V. & Stollar D. (1984)

Interactions of H1 and H5 histones with polynucleotides of B- and
Z-DNA conformations

Biochemistry 23, 2775-2782

Nordheim A., Pardue M.L., Lafer E.M., Möller A., Stollar B.D. &
Rich A. (1981)

Antibodies to left handed Z-DNA bind to interbands of Drosophila
polytene chromosomes

Nature (London) 294, 417-422

Nordheim A., Tesser P., Azorin F., Kwon J.H., Möller A. & Rich
A. (1982)

Isolation of Drosophila proteins that bind selectively to left-handed
Z-DNA

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 7729-7733

Nordheim A. & Rich A. (1983)

Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences

Nature (London) 303, 674-679

Pohl F.M. & Jovin T.M. (1972)

Salt induced co-operative conformational change of a synthetic DNA : Equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC)•poly(dG-dC)

J.Mol.Biol. 67, 375-396

Revet B., Zarling D.A., Jovin M.T. & Delain E. (1984)

Different Z-DNA forming sequences are revealed in ϕ X174 RFI by high resolution darkfield immuno-electron microscopy

EMBO J. 3, 3353-3358

Rich A., Nordheim A. & Wang A.H.-J. (1984)

The chemistry and biology of left handed Z-DNA

Ann.Rev.Biochem. 53, 791-846

Riggs A.D., Suzuki H. & Bourgeois S. (1970)

Lac Repressor-Operator Interaction I.Equilibrium studies

J.Mol.Biol. 48, 67-83

Runkel L. & Nordheim A. (1986)

Chemical footprinting of the interaction between left-handed Z-DNA and anti-Z-DNA antibodies by diethylpyrocarbonate carbethoxylation
J.Mol.Biol. 189, 487-501

Vardimon L. & Rich A. (1984)

In Z-DNA the sequence G-C-G-C is neither methylated by Hha I methyltransferase nor cleaved by Hha I restriction endonuclease
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 3268-3272

Vasicek T.J., McDevitt D.E., Freeman W.M., Fennick B.J.,

Hendy G.N., Potts J.T., Rich A. & Kornberg H.M. (1983)

Nucleotide sequence of the human parathyreoid hormone gene
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 2127-2131

Viegas E., Derbin C., Malfoy B., Taillandier E., Leng M. & Dutrillaux B. (1983)

Z-DNA immunoreactivity in fixed metaphase chromosomes of primates
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 5890-5894

Wang A.H.-J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L.,
van Boom J.H., van der Marel G. & Rich A. (1979)

Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at
atomic resolution

Nature (London) 282, 680-686

Watson J.D. & Crick F.H.C. (1953)

Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose
nucleic acid

Nature (London) 171, 737

Kapitel 8

DANKESADRESSEN

Für ihre Mithilfe möchte ich mich bei folgenden Damen und Herren ganz herzlich bedanken :

- Herrn Prof. Dr. C. C. Kuenzle für die Unterstützung während
der Doktorandenzeit, für die Korrektur
des Manuskriptes und das Referat
- Herrn Prof. Dr. E. Jenny für das Korreferat
- Herrn Dr. R. Hobi für die freundschaftliche Betreuung
und Anleitung bei meiner Arbeit
- Frau E. Arnold und B. Ruf für die praktische Unterstützung
bei den Laborarbeiten
- Herrn M. Bischoff für die Hilfe bei Informatikproblemen
und die Weiterführung dieser Arbeit
- Frau A. Hug für die fotografische Gestaltung

Die vorliegende Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfond unterstützt, Kredit Nr. 3.391-0.83.

Kapitel 9

LEBENS LAUF

Stephan Hubert Gut , geboren am 13.Dezember 1959 in Luzern ,
Bürger von Mauensee (LU).

- 1966 - 1971 Primarschule in Willisau und Hohenrain
- 1971 - 1978 Kantonsschule in Hochdorf und Reussbühl
- 1978 Matura Typus C
- 1978 - 1983 Studium der Tiermedizin an der Veterinär-
medizinischen Fakultät der Universität Zürich
- 1983 Staatsexamen als Tierarzt in Zürich
- Seit November 1983 Doktorand am Institut für Pharmakologie
und Biochemie der Veterinärmedizinischen Fakultät Zürich
(Prof. Dr. med. et phil. II C. C. Kuenzle)
- 1986 - 1987 Teilnahme am 19.Postgraduate Kurs in Experi-
menteller Medizin und Biologie der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

